

소 수정란이식기술에 있어서의 일반적인 위생처리방법

석 호 봉
국립종축원

General Sanitary Procedures in Bovine Embryo Transfer Techniques

Ho Bong Seok

National Animal Breeding Institute, Sunghwan

서 론

수정란을 채취하고 이식하는 과정에서 가축과 수정란에 여러 가지 병원균의 오염을 방지하기 위한 위생처리방법은 송아지 출산의 최종결과에 나쁜 영향을 주기 때문에 대단히 중요한 과제이다(Seidel, 1981).

수정란이식기술은 공란우의 품종, 계절, 지리적 조건, 시술자의 경험, 시설물과 기구의 준비상태에 따라 그 성공률이 달라질 수 있다. 물론 좋은 시설물에서 위생처리가 잘된 기구 사용으로 좋은 결과를 나타낼 수 있을 것이다.

수정란이식 장소는 시설과 기구가 잘 갖추어져 좋은 조건에서 시술할 수 있는 가축병원에서의 이식과, 그렇지 못한 농장에서의 이식으로 구분된다. 가축병원에서의 이식은 공란우와 수란우를 병원에 옮겨온 후 시술자의 직접적인 통제하에서 여러가지 건강체크의 준비기간을 거친후 시술하기 때문에 시술자는 어느정도 자신감을 가지고 할 수 있으나 많은 비용을 축주에게 청구하게 된다(Elsden, 1980).

농장에서의 이식은 축주가 직접 개입하여 시설이나 기구등을 농장의 것으로 이용할 수 있기 때문에 비용을 절감할 수 있게 된다.

그러나 최근 동결수정란이나 비외과적 이식기술의 개발로 인공수정기술의 체제와 같이 특별한 시설을 갖추고 능력이 우수한 공란우만을 사육하였다가 채란하여 수정란을 생산공급 하는 곳과, 수의사나 수정사를 통하여 농장 현장에서 이식하는 곳으로 구분되어 점차 그 방법이 전문화 또는 분업화되고 있어 이식장소가 축주위주의 편리한 방법으로 되어가고 있다.

수정란이식을 주종으로 하고 있는 가축병원이나 기관은 이식하기 위해 들어오고 나가는 가축의 건강

체크나 백신프로그램을 바르게 작성하여 것을 어김없이 준행하여야 한다.

소가 들어오면 우군과 분리 사육하고 임신감정이나 번식상태를 검사하고 특수질병에 대하여는 혈청검사를 위하여 채혈도 고려하여야 한다. 검사결과는 병원규칙이나 지역 및 국가 가축위생규정에 따라 처리되어야 하며 이에 따른 적절한 백신접종계획이 선행되어야 한다.

수정란이식에 종사하는 사람은 동물과 농장간의 질병전파를 방지하는 방법을 염두에 두어야 한다. 이식에 사용되는 모든 기구는 소독되어야 하고 재소독 없이는 한 동물 이상의 사용은 금해야 한다.

실험기재는 취급하기 편리하고 동물보정은 스트레스 극소화 및 상해를 줄일 수 있도록 보정틀에 고정하고 기타 여러 가지 유도책이 보완되어야 한다. 공란우와 수란우의 사양관리는 이식을 성공시키기 위해 표준영양요구량에 의거 사육되어야 한다.

수정란이식을 하고자 하는 축주에게는 사전에 건전한 위생프로그램을 농장현실에 맞게 제시하여 과배란처리 및 성주기동기화, 수정란의 이식, 그리고 이식후 분만시까지의 사양관리에 만전을 기하도록 직접 교육시키거나 수의사가 직접 관여토록 한다 (Mapletoft, 1980).

여기에서 다루고자 하는 내용은

첫째, 일반적인 위생처리방법으로 공란우 선발에서부터 수정란이식까지의 전반적인 위생상태와,

둘째, 채취한 수정란의 위생적인 취급방법에 대하여 검토하고자 한다.

소 수정란 이식에 있어서의 일반적인 위생처리방법

1. 공란우 선발과 과배란 처리

공란우는 채란장소에 도착하기 전에 경험이 있는 전문가에 의해 번식기능 및 건강검사를 받아야 한다(Mapletoft, 1982).

백신은 과배란 처리전에 실시하고 모든 건강검사는 채란전에 체크되어야 한다.

공란우는 정상적인 번식주기가 있어야 하고 과배란 처리전에 직장검사로 정상황체 유무를 파악해야 한다. 간혹 자궁감염, 난소낭종등 번식장애 문제가 있는 소는 채란전에 치료를 해야할 것이다. 투약되는 모든 약제(gonadotrophins 및 prostaglandin등)는 국가규정에 따라야 하며 유효기간 내에서 사용하여야 하고 순서에 준해서 투약하여야 한다. 멸균 주사침과 주사기는 충분히 준비하여야 하며 축주로 하여금 처리될 때는 정확하고 분명한 지시서로서 쉽게 이해시켜주도록 하여야 한다. 특히 gonadotrophin의 과용 또는 남용되지 않도록 하는 것에 주의하여야 한다. 불필요한 주사등으로 과도하게 자극하거나 흥분시키면 양질의 수정란을 회수하는데 저해요인이 되며 정상적인 발정주기로 되돌아 가는데 지장을 주게 된다. 시술자는 공란우의 영양상태, 수란우의 성주기동기화, 발정조사 및 공란우의 번식 계획등을 잘 검토하여 실제 이식할 때 큰 문제가 일어나지 않도록 하여야 한다(Mapletoft, 1982; Foote와 Onuma, 1970; Willet 등, 1951; Umbaugh, 1949). 사용되는 정액은 사용전 믿음만한 정액실험실을 통하여 검사를 받아야 한다.

2. 수정란 채란

공란우는 강제적으로 다루거나 과도한 스트레스를 주지 않도록 해야 하며 적절한 보정과 진정제나 안정제의 투약으로서 안전하게 그리고 작업하기 편리하게 다룰 수 있다. 수정란 채란은 순서에 준하되 위생적인 청결이 가장 중요한 사항이다.

채란시 멸균 catheter가 오염물이 많은 외부 생식기를 통해서 자궁내로 주입되어지기 때문에 수정란이 유해한 오염물질로 오염될 기회가 많으므로 외음부와 꼬리를 소독제로 잘 닦아 내고 청결하게 하여야 한다. 경막마취는 주사부위, 사용약제, 약제의 농도와 용량등에 특별히 주의를 하여 투여해야 한

다.

공란우의 몸체나 분비에액에 접촉되었던 모든 수정란 채란용기는 철저히 소독하거나 새로운 것으로 바꾸어 사용하도록 해야 한다. 특히 채란용 tygon 연결관, catheter, 회수용 용기등은 배지나 자궁액과 접촉된 것은 재멸균하지 않고는 다른 공란우에 사용하지 않아야 한다.

Catheter 끝에 있는 balloon에 과도한 공기주입으로 자궁과열이나 자궁손상이 생기지 않도록 하고 채란시 자궁의 무리한 손놀림이나 catheter의 자극이 자궁 출혈의 원인이 될 수 있으므로 주의하여야 한다(Elsden, 1980).

관류액의 주입량과 회수량을 조사하고 주입량보다 회수량이 적을 경우 관류액이 역류되는 것인지 또는 자궁에 침공이 생겨 복강내로 유입되는 것인지 그 원인을 빨리 파악하여 적절히 조치해야 한다. 관류액내에 있는 수정란은 빨리 찾아내기 위하여 여과기를 사용하게 되는데 여과방법은 제조회사의 지시에 따라 실시해야 한다(Mapletoft, 1985).

3. 수정란 분리 및 검사

수정란의 분리와 검사실은 온도, 습도, 환기, 조명이 잘 되어 있고 작업하기 편리한 실험실에서 검사되어야 한다.

농장에서 채란할 때는 근본적으로 적절한 곳이 되지 못하기 때문에 분리하기에 좋은 위치를 선택하여야 한다. 즉 사료창고나 축사 같은 먼지가 많은 곳은 피하는 것이 좋다. 채란된 수정란은 20~30℃의 온도나 장기 보존을 위해 낮은 온도에서 보존되어야 한다.

수정란이나 관류액에 접촉하는 플라스틱 및 초자기구는 멸균 소독한 것으로 사용하고 소독된 초자기구는 중금속(납, 철, 수은등)같은 수정란에 유해한 무기물을 함유하는 경우가 있다. 중금속의 오염은 물이나 소독제, 먼지를 통하여 오염되기 쉬우므로 이 때는 오염원을 빨리 제거하고 세척방법을 개선해야 한다.

축사의 악취, 소독약, 파리약, 염산, 산, 옥도 및 담배연기는 수정란에 유해하며 실험실과 초자기구에 묻혀있는 오물도 해가 될 수 있다. 모든 용기 즉 피펫, 주사기, 필타등도 소독되어야 하고 사용전 공란우의 번호와 동일하게 모든 기구 싼을 표시하여 사용한다면 이 문제는 해결된다.

관류액은 사용하기 전에 0.22 μ m 이상 크기의 입자를 여과할 수 있는 여과기로 여과하여야 한다(Mapletoft, 1985).

모든 수정란은 검사전에 완전히 세척해야 하고 표준방법에 의하여 수정란의 발육단계와 질을 구분하여야 한다(Lindner와 Wright, 1983; Elsdén, 1980).

4. 수정란 이식

수정란 이식에 있어서 가장 중요한 것은 우수한 수란우를 선발하는 일이다.

수란우는 정상발정주기를 가지며 건강하고 정상적인 생식기를 가지고 있어야 한다(Mapletoft, 1980, 1982; Wright, 1981; Elsdén, 1980).

치너우를 수란우로 사용할 경우에는 발육이 좋고 체중이 어느정도(홀스타인, 400kg) 나가는 것을 선발해야 한다. 육우나 젖소의 경산우는 생리적으로 건강하고 정상주기와 에너지 균형이 양(+)성적인 것으로 사용하여야 한다. 그러나 문제우나 낮은 산유량을 가지는 육우는 수란우로 적당하지 않다.

수란우의 발정시기는 공란우와 일치하거나 24시간 이내이어야 한다(Wright, 1981). 성주기 동기화의 간격이 클수록 임신율은 떨어진다. 수란우는 취급하기 좋은 장소에서 안정시키고, 이식전 과도한 취급은 삼가하여야 한다.

수정란 이식방법은 외과적과 비외과적으로 행할 수 있다. 외과적이식은 비외과에 비해 지금까지 약간 높은 임신율을 보이고 있으나, 이식시간이 길어진다(Elsden, 1980; Mapletoft, 1980). 이 두 가지 방법간에는 모두 서로의 장단점이 있으나 경비절감, 축주선호도와 시술의 편의성 때문에 비외과적 이식이 더욱 많이 행해지고 있다.

1) 외과적 이식

외과적이식시 위생적 조치는 일반 환축의 수술과 같으며 수술장소, 수술부위, 수술자, 기구 등이 모두가 깨끗하고 무균적인 시술이 되도록 한다.

진정제와 국소마취제는 지시된 용량으로 사용하고 이식전 24시간 사료와 물급여를 중지하면 생식기를 만지는데 쉬워진다. 수술부의 절개는 피부, 근막, 근육, 복막 순으로 절개하고 수정란의 이식은 황체가 확인된 자궁선단에 구멍을 내어 조용히 주입한다. 봉합은 절개의 역순으로 하며 이식하는데 약 15분 소요된다. 이식된 수란우는 조용한 곳에서 관리하고 이식후 하룻밤 또는 여러 시간 다른 소와 격

리시킨다. 봉합사는 10-14일후 제거한다.

2) 비외과적 이식

이식용 피펫트가 자궁경관을 통과할 수 없는 경우에는 비외과적으로 시도하지 않아야 한다. 수란우는 조심스럽게 다루고 보정틀에 보정하며 이식은 조용히 하여 갑작스러운 움직임으로 자궁내 손상이 없도록 조치하여야 한다.

경막마취는 외과이식의 경우와는 달리 필수적이다. 그러나 시설이 알맞는 곳이면 진정제 사용은 필요치 않다. 배란부위의 선정을 위해 직장검사를 하여야 하고 외음부 부위를 깨끗이 해서 어떠한 오염물도 외음부내로 들어가지 않도록 청결히 하여야 한다(Wright, 1981).

5. 수정란 동결 및 융해

동결조작은 청결하고 먼지가 없고 온도가 조절된 실험실에서 수행하여야 한다. 농장에서의 동결은 이동실험실이나 농장에서 특별히 준비된 곳에서 할 수 있다. 동결방법은 여러가지로 동결기에 의거 실시하며 그 방법은 다양하다(Schneider와 Mazur, 1984; Seidel등, 1983; Leibo, 1983; Maurer, 1978). 어떤 방법을 사용하던지 수정란은 동결전에 잘 씻어내야 한다. 동결에 사용한 기구는 1두 이상의 공란우에는 사용하지 않아야 한다.

동결된 수정란은 공란우별로 구분되어 회사나 국제수정란협회에 규정된 양식에 의거 표식되고 동결증명서가 준비되어야 한다. 증명서 또는 등록서식에 대한 정보는 믿을만한 종축협회로부터 얻을 수 있다.

융해시의 실험실 조건은 동결할 때와 동일하다. 즉 청결하고 20-30 $^{\circ}$ C의 정온으로 유지되는 먼지가 없는 장소이다.

융해방법은 동결의 역순으로 실시하며 동결증명서의 지시에 따라 시행해야 한다. 그리고 융해된 수정란은 가능한 빨리 이식되어야 한다.

수정란의 위생적인 취급방법

1. 배 지

수정란과 접촉되는 모든 배지, 용액, 혈청, 효소 및 동결보존제는 오염물이나 미생물에 오염되지 않아야 한다. 이들은 이미 만들어져 소독처리된 것을

사용하던가 실험실에서 소독처리되어야 한다. 우혈청알부민(BSA) 분획 V나 광선조사로 소독된 혈청은 그냥 사용할 수 있다. 채란에 사용되는 혈청 배양액과 수정란의 세척액은 수입국에 의해서 인가된 것을 사용해야 한다. 대부분 생물학적으로 활성화된 용액은 여과에 의하여 소독되어야 한다. 대량을 여과할 경우 사전에 0.22 μm 여과지로 여과하면 편리하다. 여과시에는 음압보다 양압이 단백질 함유액의 거품을 방지하기 위하여 사용되며 중탄산염으로 완충된 용액은 pH가 크게 올라간다. 염기염액은 습열(스팀소독)에 의하여 소독할 수 있다. 이때 121 $^{\circ}\text{C}$ 에 15파운드 압력으로 30분간 소독해야 한다. 모든 병의 마개는 증기소독시 꼭 끼우지 말며 500ml 이하의 양은 분병하지 말고 적절한 조건하에 소독해야 한다.

2. 기 구

소독이 요구되는 모든 비일회용 물건은 먼저 독성이 없는 세척제로 닦아낸 다음 증류수로 닦고 말리며 멸균하기 위해 포장한다. 여러가지 소독 방법이 응용되고 있으나 소독하고자 하는 재료에 따라 다르다.

1) 건 열

고열에 의해 손상되지 않는 재료는 160 $^{\circ}\text{C}$ 에 2시간 동안 소독한다. 건열오븐에는 온도 감응계를 장치하여 요구되는 온도에 도달되도록 조절한다.

2) 습열(증기소독)

121 $^{\circ}\text{C}$ 에 15파운드의 증기압으로 최소한 15분간 유지되도록 한다. 지시계는 포장된 것을 구입하고 적절한 소독이 이루어졌을 때 색깔이 변하는 것이어야 한다. 소독재료는 가제나 다른 포장지에 싸서 증기가 직접 쏘이도록 하고 나중에 미생물이 남아 있지 않도록 하여야 한다.

3) Ethylene oxide(EO)가스 혼연소독

EO가스 소독은 재료 1000 cm^3 당 EO가 최소한 500mg소요되며 최소한 12시간 동안은 소요되어야 한다. 소독할 물건은 청결하고 건조되어 가스가 쉽게 침투되도록 준비되어야 한다. EO가스는 대부분의 재료에 침투가 가능하나 장시간 밀폐된 곳에서는 어떤 플라스틱이나 고무질을 녹일 수 있기 때문에 소독후 적절히 환기가 필요하다. 충분한 환기 후에도 남아있는 EO가스가 수정란에 유해하므로 24~48시간 경과한 후에 사용하여야 한다. 가열환기는 더욱

효과적이며 포장재료는 흡수가 잘되고 가스 유출이 빠른 재료를 사용해야 한다.

4) 방부제

알콜(70~90%) 같은 방부제가 소독부위에 가끔 쓰이며 알콜에 혼연되도록 충분한 시간이 허용되어야 한다.

3. 수정란의 일반세척

수정란의 적절한 세척은 수정란 주위에 붙어있는 대개의 병원균의 존재를 제거하는데 효과적인 것으로 알려져 있다(Singh, 1984).

세척은 깨끗한 멸균 모세피펫으로 각 단계별로 세척한다. 즉 수정란을 각 회석 때마다 살짝 흔들어 가능한 한 신속히 꺼내어 다음 회석로 옮긴다. 동일 공란우에서 채취한 수정란만을 동일액에 세척하도록 한다.

4. 수정란의 trypsin처리

수정란이 소 전염성 기관지염 바이러스(Singh등, 1982)와 수포성구내염 바이러스(Lauerman, 1985)에 노출되었을 경우를 제외하고는 일반적인 세척 방법으로 여러 가지 바이러스의 감염으로부터 예방할 수 있다. 이 두 가지 바이러스에 노출된 수정란은 효소나 trypsin으로 처리하여 이들의 감염을 예방할 수 있다. 즉 수정란을 항생제와 0.4% 우혈청 알부민을 첨가한 인산완충액(PBS)에 5회 씻어낸다. 이때 trypsin은 2가지 정제액(pH 7.6-7.8)에 통과시켜야 하고 60-90초간 처리한다. Ca^{++} Mg^{++} 이 없는 Hank's balanced salt solution에 멸균 trypsin 0.25%를 사용한다. Trypsin처리후 수정란은 항생제와 2% 혈청을 함유한 PBS에 5회 세척한다. 소혈청 알부민을 혈청으로 대체하는 것이 중요하며 trypsin처리후 그 세척한 용액에서 trypsin이 inactivation하는지를 확인해야 한다.

5. 수정란 검사

모든 수정란은 투명대가 온전하고 부착물이 없도록 하여야 한다. 수정란 확인을 위해 50배 이상에서 경검하고 수정란을 조용히 용기에 굴리면서 투명대 표면을 검사해야 한다. 이 검사는 씻은 후 또는 동결전에 수행되어야 한다.

6. 검사용 재료 채취

수정란은 수란우에 이식전에 수정란의 미생물의 상태를 시험할 수 없기 때문에 보통 공란우의 건강 상태와 종모우나 다른 재료를 검사하므로써 감염 여부를 추측할 수 있다. 보통 채취하는 재료는 채취액, 수정란세척액 그리고 동일공란우에서 채취한 잔여수정란 또는 미수정란 등이다. 만일 이러한 재료를 검사용으로 제공할 때는 다음과 같이 준비한다.

1) 채취액

최수수정란의 비중법에 따라 채취액을 멸균 메스 시린다에 담아 약 30분간 정치한 후 상층액은 버린다. 수정란을 제거한 후 바닥의 100ml액에 침전된 부분을 멸균 시린다에서 수정란 여과기로 통과시키고 최소한 30분간 정치시킨다. 여과기를 깨끗한 회수액으로 잘 씻어 낸다. 수정란을 갖고 처음의 세척된 용기로 옮긴다.

마지막으로 여과지를 씻는데 사용된 배양액 전부를 멸균병으로 옮겨 담는다.

2) 세 척

수정란의 마지막 4 번째척에 사용된 배양액을 합쳐서 보존한다.

3) 수정란 또는 미수정란

공란우에서 채취된 잔여수정란이나 미수정란을 합쳐서 10회 세척하고 보존한다. 분석하기 전에 난을 진동에 의하여 깨뜨려야 한다.

모든 재료는 검사전까지 4°C에 보존한다. 시험이 24시간이내 수행되지 않으면 -70°C에 보존한다.

채취액의 관성이 공란우의 건강상태의 기준이 될 뿐만아니라 발견된 병인체는 여러 단계 세척으로 옮긴후 마지막 세척액의 검사에서 수정란의 수란우에 질병에 노출되어 있을지의 기준으로 삼는다(Hase 등·1985). 세척액을 수정란 상태의 건강기준으로 사용된다면 세척재료 전부를 검사하는 것은 필수적이다. 즉 세척액이 2 ml로 마지막 4 회째 검사하고 혼합한 8 ml를 분석해야 한다. 수정란이나 미수정란의 검사는 수정란이 노출된 것인지 또는 적절한 세척이 이루어진 것인지의 기준이 된다. 다시 말해서 수정란의 이상유무는 같은 공란우로부터 이식할 수 있는 다른 수정란의 이상을 표시한다. 이것은 현재까지의 여러 가지 실험결과가 실증되고 있다. 예를 들면 IBR바이러스는 수정란의 발육단계나 물리적 변화에 관계없이 수정란의 ZP에 침입하기 때문에 특별한 세척방법으로 처리되어야 한다.

상기재료 외에 반드시 혈청학적으로 시험되어야

하며 수정란의 부모로부터의 다른 재료도 동시에 채취하여 권위있는 연구기관에서 검사되어야 한다. 그 검사에서 만일 특정 질병에 양성반응을 보인 공란우는 관류액이나 세척액, 수정란 및 무정란등을 검사하는 것이 중요하다.

(여기에 수록된 내용은 국제수정란이식학회(IE-TS)의 Embryo Transfer Newsletter 4권 4호(1986)의 내용중 제1장과 제2장을 발췌번역한 것임).

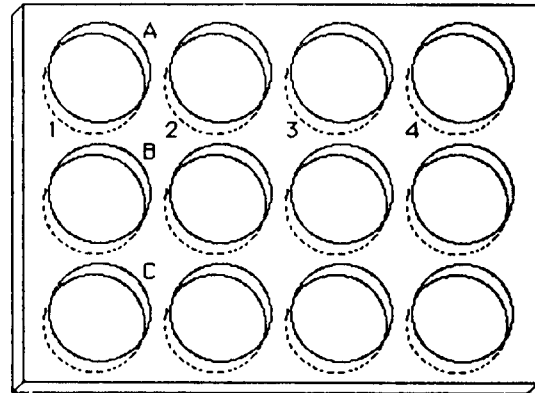


Fig. 1. These multi well plates are very convenient for carrying out embryo washing or the combined washing and trypsin treatment of embryos. Two-ml volumes are used in each well. The plates are 11.1×8.4cm have wells that are 2.4×1.7cm, and are supplied by Flow Laboratories, Farnham, Connecticut (cat. no. 76 053 05).

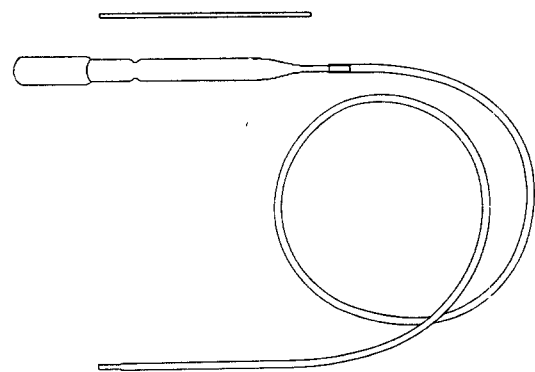


Fig. 2. Capillary tubing with an O. D of 0.7mm and a wall thickness of 0.18mm is cut into 8 -cm lengths, sterilized, and used as micropipettes. Using these micropipettes, 10 ul of fluid are transferred with the embryos when the washing or combined washing and

trypsin procedures are carried out. The pipetting device consists of a vinyl bulb (a mouth piece and rubber tubing can be substituted for this bulb); a pasteur pipette filled with absorbent cotton and with its tip removed; a 45cm piece of Silastic tubing (Dow Corning, Midland, Michigan, cat. no. 602 205); and a 1-cm piece of intravenous vinyl tubing (Bolab Incomp., Lake Havasu City Arizona, cat. no. BB317 85 size v/4) into which the micropipette fits.

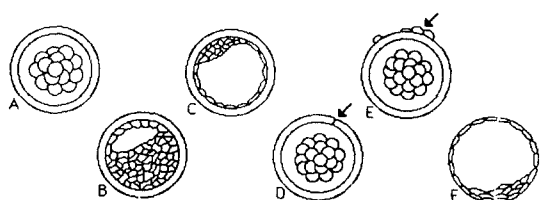


Fig. 3. Since the zona pellucida is an effective pathogen barrier, it is essential that all embryos have an intact zona pellucida and are free of adherent material.
 A, B, C = Acceptable embryos in terms of disease control.
 D, E, F = Unacceptable embryos in terms of disease control.
 D has a break in the zona pellucida.
 E has debris on the zona pellucida.
 F has no zona pellucida (hatched)

参 考 文 献

1. Adams, C.E. (1982). *Mammalian Egg Transfer*. C.R.C. Press Inc., Boca Raton, FL, USA.
2. Betteridge, K.J. (1977). *Embryo Transfer in Farm Animals*. Monograph 16, Agriculture Canada, Ottawa, Ont., Canada.
3. Bowen, R.A., Howard, T.H., Elsdén, R.P., Seidel, G.E. (1983). Embryo transfer from cattle infected with bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 1625-1628.
4. Elsdén, R.P. 1980. Bovine embryo transfer. *Proc. Soc. Therio.*, Omaha, NE USA. pp.101-133.
5. Foote, R.H. and Onuma, H. (1970). Superovulation, ovum collection, culture and transfer: A

review. *J. Dairy Sci.*, 53: 1681-1692.

5. Hare, W.C.D., Mitchell, D., Singh, E.L., Bouilant, A.M.P., Eaglesome, M.D., Ruckerbauer, G.M., Bjelanski, A. and Randall, G.C.B. (1985). Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus (BLV) control and eradication, *CAN. Vet. J.*, 26: 231-234.
7. Lauerman L.H., Stringfellow, D.A., Sparling, P.H., Caub, L.M. and Roberts, C.S. (1985). Vesicular stomatitis virus attached to zona pellucida-intact bovine embryos. *Proc. Conf. Research Workers in Animal Disease*. Chicago, IL USA, 11-12 Nov. 1985 (Abstr).
8. Leibo, S.P. 1983. Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 19: 139.
9. Lindner, G.M. Wright, R.W. Jr. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
10. Mapletoft, R.J. 1980. Embryo transfer for the practitioner. *Proc. 13th Ann. Meet. Am. Assoc. Bovine Pract.* Toronto, CANADA, pp.154-162.
11. Mapletoft, R.J. 1982. Superovulation and recovery of ova from the bovine. *Proc. Owners and Managers Workshop. VII Ann. Meet. IETS*, Denver, CO USA, pp. 37-47.
12. Mallek, Z., Guerin, B., Niebart, M., Parez, M. and Thibier, M. 1984. Consequences de la contamination *in vitro* des embryons de souris et de vaches par *Brucella abortus*. *Bull. Acad. Vet. France*, 57: 479-490.
13. Mapletoft, R.J. 1985. Embryo transfer in the cow: General procedures. *Proc. Roundtable Meet. on Sanitary Problems Related to Embryo Transfer*. Paris, 9 Dec. 1985. in press.
14. Maurer, R.R. 1978. Freezing mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology*, 9: 45-68.
15. Schneider, U. and Mazur, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relationship to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21: 68-79.
16. Seidel, G.E., Jr. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211: 351-358.

17. Seidel, G.E., Jr. and Seidel, S.M.(1981).The embryo transfer industry. In: *New Technologies in Animal Breeding*. B.G. Brackett, G.E. Seidel, Jr., and S.M. Seidel, (eds), Academic Press, New York, pp.41-80.
18. Seidel, G.E., Jr., Elsdon, R.R., Takeda, T., and Farrand, G.D. 1983. Field trials with cryopreserved bovine embryos. In: *Fertilization of the Human Egg in Vitro*. H.M. Beier and H.R. Lindner (eds), Springer-Verlag, Berlin, pp.343-352.
19. Shea, B.F. 1981. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15: 31-42.
20. Singh, E.L. 1984. Disease transmission: Embryo-pathogen interactions in cattle. *Proc. 10th Int. Congr. Animal Reproduction and A.I. Urbana-Champaign*. Vol. IV: IX-17 to IX-24.
21. Singh, E.L., Eaglesome, M.D., Thomas, F.C., Papp-Vid, G. and Hare, W.C.D. 1982a. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and bovine viral diarrhoea viruses. *Theriogenology*, 17: 437-444.
22. Singh, E.L., Thomas, F.C., Eaglesome, M.D., Papp-Vid, G., and Hare, W.C.D. 1982c. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology*, 18: 133-140.
23. *Sterilization Aids 1977*. Prepared by the Education and Research Depts. of the American Sterilizer Co., Erie, Pennsylvania.
24. Stringfellow, D.A., Scanlan, C.M., Brown, R.R., Meadows, G.B., Gray, B.W., Young-White, R.R. 1984. Culture of bovine embryos after *in vitro* exposure to *Brucella abortus*. *Theriogenology*, 21: 1005-1012.
25. Umbaugh, R.E. 1949. Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 10: 295-305.
26. Willett, E.L., Black, W.G., Casida, L.E., Stone, W.H., and Buckner, P.J. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113: 247.
27. Wright, J.M. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 15: 43-56.